

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES


Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

KR8001597 **esp@cenet**

PROCESS FOR THE PURIFICATION OF NUCLEOTIDES

Patent Number: KR8001597
Publication date: 1980-12-29
Inventor(s): CHUNG KAB TAEK
Applicant(s): MIWON CO LTD
Requested Patent: KR8001597
Application Number: KR19790002372 19790716
Priority Number(s): KR19790002372 19790716
IPC Classification: C07D473/30; C07H19/16
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

Nucleotide solns. obtained by fermentation or hydrolysis of nucleic acid were purifd. with ion-exchange resin. Nucleotide solns. adjusted to pH 9=8.0-12 were treated with strongbase anion exchange resin to remove cationic substances and treated with strong-acid cation exchange resin. Inosinic acid and quanylic acid were respectively purifd. by difference of absorption.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

⑤Int. Cl. ⑥한국분류
C. 07 D 473/30 16-E-61
C 07 H 19/16

대한민국특허청 특 허 공 보

제 537 호

④공고일자 서기 1980. 12. 29

⑩공고번호 80-1597

②출원일자 서기 1979. 7. 16

⑨출원번호 79-2372

약종화학심사담당관 진 금 섭

심사관 최 규 판

⑦발 명 자 정 감 택 부산시 동래구 수안동 대포아파트 5동 5반 307호

⑧출 원 인 미원 주식회사 대표이사 임 천 수

부산시 동래구 거제동 141번지

(전 4 면)

⑨누클레오 타이드의 정제법

발명의 상세한 설명

본 발명은 염을 함유하는 5'-누클레오타이드 함유액을 강염기성 음이온 교환수지에 통과하여 5'-누클레오타이드를 흡착시킨후 산성용액으로 용리하여 얻은 5'-누클레오타이드 함유액을 다시 유리형 강산성 양이온 교환수지에 흡착시켜 적당한 용리제를 사용하여 흡착된 5'-누클레오타이드를 용출하여 분별 제조하는 5'-누클레오타이드의 정제방법에 관한 것이다.

5'-누클레오타이드 함유액은 직접활효나 합성법에 의해 취득하거나 생체조직 또는 미생물의 배양물이나 이들의 처리물로부터 추출한 핵산에 누클레아제등의 효소를 작용시켜서 얻게 된다.

따라서 5'-누클레오타이드 함유액내에는 단백질 분해물인 아미노산류와 군체, 다당류, 유기산류, 무기염류, 색소류 등의 여러가지 불순물들을 다량 함유하고 있으므로 이들을 분리하여 정제하는 방법이 오랫동안 연구되어 왔다.

그 내용으로서는

이온교환수지법, 활성탄처리법, 이온교환막 처리법, 침전법 등이 있으나 주로 이온교환수지법이 많이 이용되어 왔으며 그중에는 양이온 교환수지와 음이온 교환수지를 사용하는 단일 이온교환수지법이 있으나 단일수지법으로는 만족할만한 결과를 얻을수 없게 되자 이들의 이온교환수지를 2가지 이상 복합하여 사용하는 방법이 활발히 연구되어져 왔다.

이 복합수지법으로서는 일본특허공보소와 40-12516과 같이 5'-누클레오타이드액을 강산성 양이온 교환수지에 접촉시켜 무기양이온 등 양이온성 불순물을 흡착 제거시키고 5'-누클레오 타이드를 흡착 폐액으로 얻은후,

이것을,

1) 염형 강염기성 음이온 교환수지에 흡착시킨후 이 수지를 산성용액으로 용리하여 얻은 용리액을 유리형 약염기성 음이온 교환수지에 빠른 속도로 통과시켜 5'-누클레오타이드를 얻는 방법과,

2) 직접 유리형 약염기성 음이온 교환수지에 흡착시킨후 수지를 약알칼리성 용액으로 용출하여 5'-누클레오타이드를 얻는 방법으로써, 이러한 방법은 강산성 양이온 교환수지에 5'-누클레오타이드 함유액을 용출하여 무기양이온성 불순물은 흡착 제거시키고 5'-누클레오타이드만을 흡착폐액으로 얻는 공정에서 흡착되지 않아야 할 5'-누클레오 타이드가 상당량 양이온교환수지에 흡착되므로 이때에 수율이 떨어지며, 통액 종료후 물로써 알출할때에 흡착폐액중의 누클레오타이드 농도가 희석이 되는 단점이 있고, 이와

같이 하여 얻은 5'-뉴클레오타이드 함유액을 다시 음이온 교환수지에 흡착시킨후 이 수지를 산성용액이나 약알칼리성 용액으로 용출하여 5'-뉴클레오타이드를 얻는 방법으로는 조미료로써 값어치가 큰 5'-이노신산 및 5'-구아닐산과 조미료로써 값어치가 적은 5'-우리딘산 및 5'-시리딜산을 분리하여 얻는다는 불충분하였다.

그리하여 본건 발명자는

상기 점토의 질과 수율도 높고 제품의 값어치가 큰 5'-이노신산과 5'-구아닐산을 함유한 5'-뉴클레오타이드를 경제적으로 얻기 위하여 소화 40-12516과는 달리 그 동액순서를 바꾸어 5'-뉴클레오타이드 함유액을 먼저 강염기성 음이온 교환수지에 동액하여 흡착시킨후 이 수지를 산성용액으로 용출하여 정제된 5'-뉴클레오타이드를 얻은후 이것을 다시 강산성 양이온 교환수지에 동탕하여 수지에 흡착시킨후 물로써 서서히 용출하여 조미료로써 값어치가 큰 5'-이노신산 및 5'-구아닐산과 조미료로써 값어치가 적은 5'-우리딘산 및 5'-시리딜산을 분리하여 얻을 수가 있었다.

일본특허 공보 소화 39-2345에는

5'-뉴클레오타이드 함유액을 유리염의 강산성 양이온 교환수지 및 약염기성 음이온 교환수지를 혼상식 또는 복상식 수지탑에 SV10-20으로 통과시켜 얻은 5'-뉴클레오타이드 함유 산성 동액액을 약염기성 음이온 교환수지로 처리하는 방법이 있으나 이것은 3가지 종류의 이온교환수지를 사용하기 때문에 작업이 너무 복잡하고 또 제2공정의 약염기성 음이온 교환수지를 사용하는 방법은 역시 수율이 떨어지며, 5'-뉴클레오타이드의 농도가 희석이 되고 5'-뉴클레오타이드를 분획할 수 없는 단점을 가지고 있다.

또, 복합수지 방법으로 일본특허 공보 소화 39-23416과 같이 5'-뉴클레오타이드 함유액을 열형 강염기성 음이온 교환수지에 흡착시킨후 수지를 산성용액으로 용출하여 얻은 용액액을 유리염 약염기성 음이온 교환수지탑에 SV 10-20으로 달리 통과시켜 정제된 5'-뉴클레오타이드를 얻는 방법이 있으나 이 방법은 제2공정에서 5'-뉴클레오타이드 함유액중의 산성성분과 강한 음이온성 물질을 제거하기 위하여 유리염 약염기성 음이온 교환수지에 동액할 때에 이들외에 얼마간의 5'-뉴클레오타이드도 음이온 교환수지에 흡착되므로 수율이 떨어지고, 동액 종료후 물로써 압출한때에 흡착액중의 5'-뉴클레오타이드농도가 희석이 되는 단점이 있으며, 이렇게 얻은 5'-뉴클레오타이드는 SV10-20으로 달리 동액을 하기 때문에 더욱 5'-뉴클레오타이드중의 5'-이노신산, 5'-구아닐산, 5'-우리딘산, 5'-시리딜산을 분획한다는 것은 조금도 기대하기 어려운 발명이라는 것을 알고 본건 발명자는 염을 함유한 5'-뉴클레오타이드 함유액을 먼저 강염기성 음이온 교환수지에 동액하여 5'-뉴클레오타이드 함유액중 양이온, 중성염, 색소등의 수지에 흡착되지 않는 불순물을 흡착액으로 상당량 제거하고 음이온 교환수지에 흡착된 5'-뉴클레오타이드류를 산으로 용출하여 정제된 5'-뉴클레오타이드를 얻은후 이것을 다시 강산성 양이온 교환수지에 동탕하여 음이온성 물질색소등의 수지에 흡착되지 않는 불순물을 흡착액으로 제거한 후 수지에 흡착된 5'-뉴클레오타이드를 물로 용출하여 정제된 5'-뉴클레오타이드를 얻으므로써,

음이온성 불순물을 강산성 양이온 교환수지를 사용함으로써 제거할 수 있고,

양이온성 불순물을 강염기성 음이온 교환수지를 사용함으로써 서로 보완하여 불순물을 제거할 수 있어서 적은량의 양이온교환수지를 이용하여 조미료로써 값어치가 큰 5'-이노신산과 5'-구아닐산 그리고 값어치가 적은 5'-우리딘산과 5'-시리딜산을 만족스럽게 분리할 수 있었다.

좀더 구체적으로 설명하면

뉴클레오타이드 함유액을 pH 8-12로 조절한 후,

먼저 강염기성 음이온 교환수지(R-OH형)에 동액하여 대부분의 뉴클레오타이드를 수지에 흡착시키고

수지에 흡착되지 않은 누클레오타이드, 염기 및 불순물과 분별을 한 후 수지에 흡착된 누클레오타이드를 황산(鎔酸)으로 용리하여 얻은 5'-누클레오타이드액은 양이온성 물질이 제거되었기 때문에 산성용액에서 양이온성을 나타내는 것은 5'-누클레오타이드 분임으로 이것을 적은량의 강산성 양이온 교환수지를 사용함으로써 많은양의 5'-누클레오타이드를 용착시킨수 있고 경제 효과가 커서 만족할만한 결과를 얻을수 있었다.

다시 말하면 음이온 교환수지에 의하여 양이온을 제거시킨 누클레오타이드액을 양이온 교환수지상에 통과시키기 때문에 제2공정인 분리조작에 쓰이는 수지는 누클레오타이드와 결합할 수 있는 수지량이면 소량으로도 충분하게 되고 양이온이 제거된 누클레오타이드액을 강산성 양이온 교환수지에 통과하고 순수로써 용리하기 때문에 용리후의 양이온 교환수지는 재생을 하지 않고 5-6회 사용할 수 있다는 이점도 있다.

또한 양이온 교환수지를 사용함으로써 수지에 흡착되는 누클레오타이드와 흡착되지 않는 누클레오타이드 및 산성 또는 중성의 불순물과 분별되기 때문에 아주 고순도의 누클레오타이드 제품을 얻을 수 있다.

여기에 사용되는 음이온 교환수지로서 Diaion PA 406, Diaion PA 408, Diaion PA 404, Diaion PA410, Diaion20A Diaion SA 21A, Amberlite IR 120, Amberlite IRA 400, Amberlite IRA 402, Amberlite IRA 410, Amberlite IRA 411, Leioatit M 600, Daivex 1, 2 등이 사용될 수 있고 양이온 교환수지로서는 Diaion SK 106, SKIB SK 110, PK 212, PK 208, PK 216, Amberlite IR 120, IR 200, Lewatits 100, Dawex 50등이 사용될 수 있다.

상세한 것을 실시예에 따라 설명하면 다음과 같다.

실시예 1)

리보핵산을 방선균의 배양으로써 얻은 요소액으로 분해하여 얻은 여액 13.8ℓ를 pH8-11로 조절한 후 Diaion PA 408수지 2ℓ를 증진한 수지상에 SV=1의 속도로 밑에서부터 위로 통액하여 대부분의 누클레오타이드를 수지에 흡착시키고 수지층을 수세후 IN HCl로 서서히 SV=0.5로 용리하여 양이온성 물질이 제거된 누클레오타이드 함유액을 얻어 이것을 다시 SKIB수지 4ℓ를 증진한 수지상에 위에서 밑방향으로 SV=1로써 용액하여 누클레오타이드를 수지에 흡착시킨후 물로써 서서히 SV=0.3으로 용리하여 흡착력의 차이에 의하여 PH 1.8~3.2사이에서 분별 회수 하였다.

이때 우리딜산이 먼저 유출되고 이노신산, 구아닐산, 시티딜산의 순서로 용출되어 나왔다.

이들을 각각 분획하여 NaOH로써 pH 7.0-8.5로 조정후 공지의 방법에 의하여 감압하에 농축하여 50%알수 배탕으로 결정을 석출시켜서 우리딜산 나트륨 8.6g, 이노신나트륨 12.5g, 구아닐산나트륨 11.8g, 시티딜산나트륨 9.7g을 얻었다. 이때의 제품의 순도는 액체크로마토그래피에 의한 분석결과 각각 99.5%, 99.2%, 99.1%, 99.3%를 나타내었다.

실시예 2)

직접 발효에 의하여 얻은 이노신산과 구아닐산을 함유한 액 35ℓ를 pH 9-12로 조절한 후 SA20A 수지 1.5ℓ의 수지층에 SV=1로써 밑에서 위로 통액하여 이노신산과 구아닐산을 수지에 흡착시키고 수지층을 수세후 2NHCl로 서서히 SV=1로 용리하여 얻은 이노신산과 구아닐산을 다시 Amberlite IR 120 3ℓ의 수지층에 흡착시킨 후 물로써 서서히 SV=0.5로 용리하여 흡착력의 차이에 의하여 pH2.0-2.8에서 이노신산과 구아닐산의 부분을 회수한다.

다음 공정은 실시예 1)과 같은 방법으로 하여 이노신산 나트륨과 구아닐산 나트륨 혼합결정 30.1g을 얻었으며, 이때의 수율은 86%이었다.

㉞특허청구의 범위

직접발효 및 리보펙산 분해에 의하여 얻은 뉴클레오타이드 함유액을 pH8.0-12로 조절한 후 먼저 강압기성 음이온 교환수지로 처리를 하여 퍼치리액중에서 양이온성 물질만을 제거시킨후, 이것을 다시 강산성 양이온 교환수지 처리를 하여 그 흡착력의 차이에 의하여 이노신산과 구아닐산을 얻는 것을 특징으로 하는 뉴클레오타이드 나트륨의 정제법.